

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Valerija Fabijanić**  
7110/N

**UTJECAJ LOKACIJE RASTA NA FENOLNI SASTAV  
LISTOVA I BOBICA TRŠLJE**

**ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: *doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić*

**Zagreb, 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

### UTJECAJ LOKACIJE RASTA NA FENOLNI SASTAV LISTOVA I BOBICA TRŠLJE

Valerija Fabijanić, 7110/N

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj lokacije rasta na količinu ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola kod listova i bobica tršlje (*Pistacia lentiscus*). Nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije, masene koncentracije ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola određivane su spektrofotometrijskim metodama. Dobiveni rezultati ukazuju na značajno veće koncentracije svih promatranih spojeva u listovima tršlje u odnosu na bobice. U listovima i bobicama s Hvara zabilježena je najveća koncentracija ukupnih flavonoida, u vrijednosti 16,49 mg QE/g kod listova i 2,71 mg QE/g kod bobica. Na istoj lokaciji određene su i najveće koncentracije flavonola, u iznosu od 9,02 mg QE/g kod listova i 4,64 mg QE/g kod bobica. Hidroksicimetne kiseline su u najvećoj koncentraciji pronađene u listovima sa Korčule, u iznosu 7,29 mg CAE/g i bobicama iz Barbarige u vrijednosti 3,98 mg CAE/g. Razlog varijabilosti u rezultatima može se pripisati geografskom položaju i klimatskim uvjetima lokacije.

**Ključne riječi:** flavonoidi, flavonoli, hidroksicimetne kiseline, tršlja

**Rad sadrži:** 30 stranica, 15 slika, 2 tablice, 44 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

**Datum obrane:** 9.srpnja 2018.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Nutrition

Department of Food Engineering  
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

## THE INFLUENCE OF GROWTH LOCATION ON PHENOLIC COMPOUNDS OF MASTIC TREE LEAVES AND BERRIES

Valerija Fabijanić, 7110/N

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effect of growth location on the amount of total flavonoids, hydroxycinnamic acids and flavonols in leaves and berries of mastic tree (*Pistacia lentiscus*). After ultrasound extraction, mass concentrations of total flavonoids, hydroxycinnamic acids and flavonols were determined by spectrophotometric methods. The obtained results indicate significantly higher concentrations of all the observed compounds in leaves compared to berries. The highest concentrations of total flavonoids were identified in leaves and berries from Hvar, leaves contain 9,02 mg QE/g while berries contain 4,64 mg QE/g. At the same location, the highest concentrations of flavonols were determined in the amount of 9.02 mg QE/g in leaf and 4.64 mg QE/g in berries. The highest concentration of hydroxycinnamic acids is identified at leaves from island Korčula in amount of 7,29 mg CAE/g while the berries from Barbariga carry an amount of 3,98 mg CAE/g. The cause of such variability in results can be attributed to geographical location and climatic conditions of those places.

**Keywords:** flavonoids, flavonols, hydroxycinnamic acid, *Pistacia lentiscus*

**Thesis contains:** 30 pages, 15 figures, 2 tables, 44 references,

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Ivona Elez Garofulić

**Technical support and assistance:** PhD Ivona Elez Garofulić

**Defence date:** 9.srpnja 2018.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
<b>2.1. TRŠLJA</b>	<b>2</b>
<b>2.1.1. KEMIJSKI SASTAV TRŠLJE</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. PRIMJENA TRŠLJE</b>	<b>3</b>
<b>2.2. FENOLNI SPOJEVI TRŠLJE</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1. FENOLNE KISELINE</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1.1. HIDROKSICIMETNE KISELINE</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1.2. HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2. FLAVONOIDI</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2.1. FLAVONOLI</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2.2. FLAVONI</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2.3. FLAVANONI</b>	<b>9</b>
<b>2.2.2.4. IZOFLAVONI</b>	<b>9</b>
<b>2.2.2.5. FLAVAN-3-OLI</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2.6. ANTOCIJANIDINI</b>	<b>10</b>
<b>2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA</b>	<b>11</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>13</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b>	<b>13</b>
<b>3.1.1. POSTUPAK EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA LISTOVA I BOBICA TRŠLJE</b>	<b>13</b>
<b>3.2. METODE RADA</b>	<b>14</b>
<b>3.2.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJA UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I FLAVONOLA</b>	<b>17</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>21</b>
<b>4.1. UKUPNI FLAVONOIDI</b>	<b>21</b>
<b>4.2. UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE</b>	<b>23</b>
<b>4.3. UKUPNI FLAVONOLI</b>	<b>24</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>26</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>27</b>

## 1. UVOD

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je mediteranski zimzeleni grm čiji su listovi i bobice našli široku primjenu u tradicionalnoj medicini (Rodríguez-Perez i sur., 2013). Bogati su izvor esencijalnih ulja, masnih kiselina i fenolnih spojeva. Iako se primarno koriste smola i eterično ulje ove samonikle biljke, ekstrakti fenolnih spojeva imaju veliku važnost u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog dokazanog antioksidativnog, protuupalnog i heteroprotektivnog djelovanja. Kako bi izolacija fenolnih spojeva bila što učinkovitija, u posljednje vrijeme se koriste suvremene metode ekstrakcije, koje smanjuju vrijeme ekstrakcije i količinu korištenog otapala, te povećavaju prinos ekstrakcije (Dahmoune i sur., 2014).

Najzastupljeniji spoj u tršlji je galna kiselina, odnosno njeni derivati. Zabilježene su i značajne količine flavonola, uglavnom miricetina i njegovih derivata (Romani i sur., 2002). Antocijanini ekstrahirani iz bobica tršlje koriste se u prehrambenoj industriji kao prirodna bojila hrane, zbog karakterističnog crvenog pigmenta (Mehenni i sur., 2016). Na koncentracije fenolnih spojeva u biljkama utječu brojni faktori, poput klimatskih uvjeta, stupnja zrelosti, dostupnost vode, geografsko podrijetlo, termin berbe i slično (Belhachat i sur., 2017).

Stoga je cilj ovog rada bio odrediti utjecaj lokacije na masene koncentracije ukupnih flavonoida, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola u listovima i bobicama tršlje.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. TRŠLJA

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je vazdazeleni grm ili nisko stablo iz porodice vonjača (*Anacardiaceae*) (Dahmoune i sur., 2014). Raste u sastavu makije na sunčanim, stjenovitim staništima mediteranskog područja, na plitkim i skeletnim tlima. U Hrvatskoj raste u priobalnom području uzduž Jadranskog mora (Istra, Kvarner, Dalmacija). Naraste do visine 5m tvoreći dobro razvijen korijenov sustav. Kora je u mladosti zelenkastosiva i glatka, a kasnije postane tamnozeleno i ispucana na sitne ljuske. Listovi su kožasti, ovalni, goli, dugi 5-10cm, parno perasti, sastavljeni od 3-5 jajolikih lisaka koje su duge 2-4cm. Glavna peteljka im je spljoštena i žljebasta, karakterističnog mirisa. Dvodomni cvjetovi su mali, građeni od jednostavnog ocvijeća koje čini 3-5 tamnocrvenih listića. Cvatu od ožujka do svibnja, kada ih posjećuju pčele koje sakupljaju pelud. Plodovi su male, okrugle koštunice veličine graška, crvene boje i gusto zbijeni na granama (Slika 1). Dozrijevaju u kasnu jesen kada postanu crni. (Nikolić i sur., 2008).



**Slika 1.** Bobice i listovi tršlje (Nikolić i sur., 2008.)

### **2.1.1. KEMIJSKI SASTAV TRŠLJE**

Tršlja sadrži čak 96 različitih spojeva eteričnih ulja (Dahmoune i sur., 2014), što čini najveći udio u njenom kemijskom sastavu. Glavni sastojci eteričnog ulja su monoterpeni  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -mircen, limonen i seskviterpen  $\beta$ -kariofilen (Koutsoudaki i sur., 2005). Osim navedenih, zabilježena je prisutnost i drugih monoterpena poput terpinen-4-ola u listovima, sabinena u listovima i plodu, te verbenona,  $\alpha$ -terpineola, linaoola i trans-pinokarveola u smoli tršlje. Seskviterpeni se nalaze u manjim koncentracijama od monoterpena, a osim  $\beta$ -kariofilena, pronađeni su germacen-D i longifolen u nadzemnim dijelovima biljke. U smoli su uglavnom identificirani triterpeni koji imaju blagi protuupalni učinak.

U lišću i bobicama tršlje, u velikoj su koncentraciji zastupljeni fenolni spojevi, poznati po antioksidativnom djelovanju (Bozorgi i sur., 2013). Galna kiselina i njeni derivati predstavljaju 70 % ukupnih polifenola u tršlji. Zreli listovi su bogati miricetinom i njegovim derivatima (20 % ukupnog polifenolnog sastava), dok je kod mladih listova zabilježena povećana koncentracija antocijanina, koji štite fotosustav od Sunčevog zračenja (Romani i sur., 2002). Nadzemni dijelovi biljke također sadrže flavonoide, od kojih je najzastupljeniji kvercetin-3-glukozid (Bozorgi i sur., 2013).

U plodovima tršlje identificirano je 9 masnih kiselina, od kojih je najzastupljenija oleinska kiselina, a slijede ju palmitinska, linolenska, linolna, stearinska, palmitoleinska, arahidonska i gadoleinska kiselina. Udio svake masne kiseline ovisi o stupnju zrelosti samog ploda, pa tako udio oleinske kiseline raste sa stupnjem zrenja, dok se udio linolne kiseline smanjuje. Također, u početnoj fazi zrenja određena je značajna koncentracija  $\beta$ -sitosterola. Upravo zbog spomenutih masnih kiselina i fitosterola, ulje ove biljke moglo bi se koristiti u prehrani (Trabelsi i sur., 2012).

### **2.1.2. PRIMJENA TRŠLJE**

Listovi tršlje koriste se u Alžiru u tradicionalnoj medicini za liječenje ekcema, dijareje, glavobolje i infekcije grla (Cherbal i sur., 2012). U drevnoj Grčkoj, ekstrakti tršlje koristili su se u narodnoj medicini, uglavnom u svrhu protuupalnih i antiseptičkih liječenja bolesti poput dispepsije i gastralgije (Bampouli i sur., 2015). Nadzemni dijelovi biljke imaju izrazit hipotenzijski i antibakterijski učinak (Romani i sur., 2002), dok se eterično ulje tršlje koristi u parfumeriji, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Longo i sur., 2007). Blagotvoran učinak

ove biljke pripisuje se flavonoidima, antocijaninima, taninima i flavonoidnim glikozidima (Mehenni i sur., 2016). U prehrambenoj industriji, različiti dijelovi tršlje mogu se koristiti kao poboljšivači okusa i začini za meso i razne umake (Gardeli i sur., 2008). U tablici 1 može se vidjeti raznolikost u primjeni tršlje u različitim zemljama.

**Tablica 1.** Primjena tršlje u različitim zemljama (Bozorgi i sur., 2013)

PODRUČJE	DIO BILJKE	TRADICIONALNI NAČIN PRIMJENE
Alžir	Listovi	Liječenje ekcema, dijareje, glavobolje i infekcije grla
Grčka	Smola	Bol u trbuhu, dispepsija, ulkus želuca, intestinalni poremećaj, jetrena infekcija, bolesti zuba, dijabetes, hiperkolesterolemija i diuretik
	Nadzemni dio biljke	Stimulant, diuretik, hipertenzija, bubrežni kamenci, žutica, kašalj, upaljeno grlo, ekcem i bol u trbuhu
Irak	Smola	Bol u trbuhu
Italija	Listovi	Zubobolja, mikoza, herpes, abdominalna i crijevna bol, antiseptik
Maroko	Listovi	Liječenje bolesti gastrointestinalnog sustava
Portugal	Listovi	Želučani analgetik
	Korijen	Antiseptik
Španjolska	Nadzemni dio biljke	Liječenje hipertenzije
	Bobice	Liječenje gripe
Tunis	Bobice	Začin u prehrani
Turska	Listovi	Ekcem, proljev, infekcije grla, paraliza, bubrežni kamenci, žutica



## **2.2. FENOLNI SPOJEVI TRŠLJE**

Fenolni spojevi sekundarni su metaboliti, široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstenova koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih skupina. Dosad je poznato više od 8000 fenolnih struktura, od jednostavnih spojeva poput fenolnih kiselina, do velikih polimeriziranih spojeva kao što su kondenzirani tanini (Dai i Mumper, 2010). Fenolni spojevi su pronađeni u mnogim jestivim i nejestivim biljkama, te se koriste u prehrambenoj industriji zbog mnogih bioloških učinaka, poput antioksidativne aktivnosti. Sirovi ekstrakti voća, povrća, žitarica i drugih biljnih materijala bogatih polifenolima imaju sposobnost usporavanja oksidativne degradacije lipida i time poboljšavaju kvalitetu i nutritivnu vrijednost hrane (Kähkönen i sur., 1999). Zbog svog snažnog antioksidativnog djelovanja, polifenoli imaju važnu ulogu u prevenciji nekih degenerativnih bolesti poput raka i kardiovaskularnih bolesti (Manach i sur., 2004; Dai i Mumper, 2010), te nadopunjuju funkciju vitamina i enzima u obrani od oksidativnog stresa (Tsao, 2010).

Fenolni spojevi dijele se u dvije osnovne skupine:

- Fenolne kiseline
- Flavonoidi.

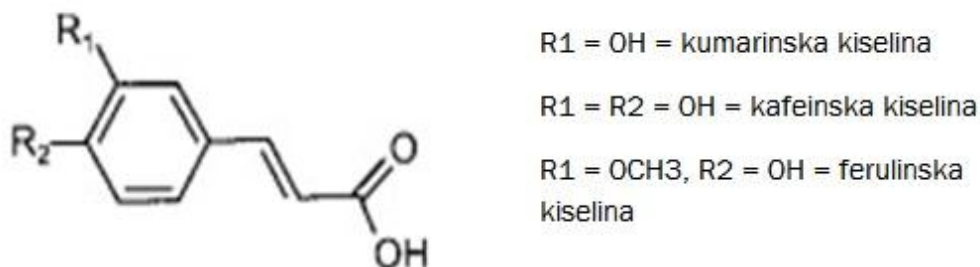
### **2.2.1. FENOLNE KISELINE**

Fenolne kiseline se prema strukturi mogu podijeliti u 2 skupine: hidroksilirani derivati benzojeve kiseline i hidroksilirani derivati cimetne kiseline. Najpoznatiji derivat hidroksibenzojeve kiseline je galna kiselina, dok su od derivata hidroksicimetnih kiselina najpoznatije kafeinska kiselina, kumarinska kiselina i ferulinska kiselina (Dai i Mumper, 2010). Dok se u voću i povrću fenolne kiseline nalaze u slobodnom obliku, u žitaricama i sjemenkama se češće nalaze u vezanom obliku, te se moraju osloboditi kiselinskom ili alkalnom hidrolizom, ili enzimima (Tsao, 2010).

#### **2.2.1.1. HIDROKSICIMETNE KISELINE**

Hidroksicimetne kiseline (Slika 2) su široko rasprostranjene u biljnom svijetu. Obično se nalaze kao esteri organskih kiselina ili glikozida ili vezani na proteine i polimere stanične stijenke. Prisutnost hidroksicimetnih kiselina u hrani značajno utječe na stabilnost, boju, okus i nutritivnu vrijednost namirnica (Chen i Ho, 1997). U listovima tršlje identificirana je mala

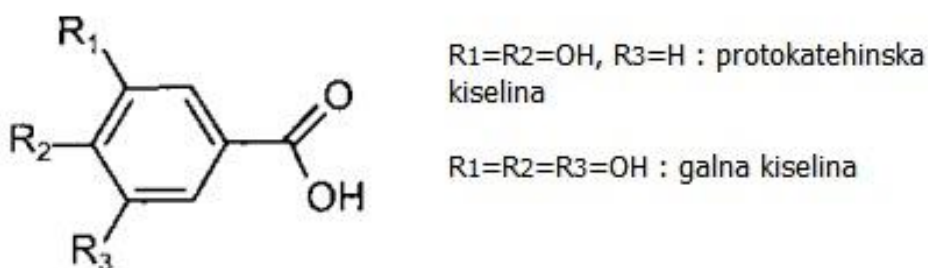
količina *p*-kumarinske kiseline (Benhammou i sur., 2008.). Derivati hidroksicimetnih kiselina najviše su zastupljeni u smoli tršlje, u obliku *o*-kumarinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline (Kaliora i sur., 2005).



**Slika 2.** Struktura hidroksicimetnih kiselina (Manach i sur., 2004)

#### 2.2.1.2. HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

U skupinu derivata hidroksibenzojeve kiseline ubrajamo galnu, vanilinsku, siringinsku, protokatehinsku i *p*-hidroksibenzojevu kiselinu (Ignat i sur., 2011), kojima je zajednička C6-C1 struktura (Slika 3). Uz izuzetak crvenog voća i luka, koncentracija tih derivata je vrlo mala u jestivim biljkama (Manach i sur., 2004). Derivati galne kiseline predstavljaju više od 70 % ukupnih fenolnih spojeva u listovima tršlje (Romani i sur., 2002), a najzastupljeniji su mono-, di-, tri-*O*-galoilkina kiseline. U bobicama tršlje identificirane su 1, 2, 3, 4, 6-pentagaloil glukoza i galna kiselina, za koje se smatra da imaju snažna antioksidativna i antitumorigena svojstva (Bozorgi i sur., 2013).

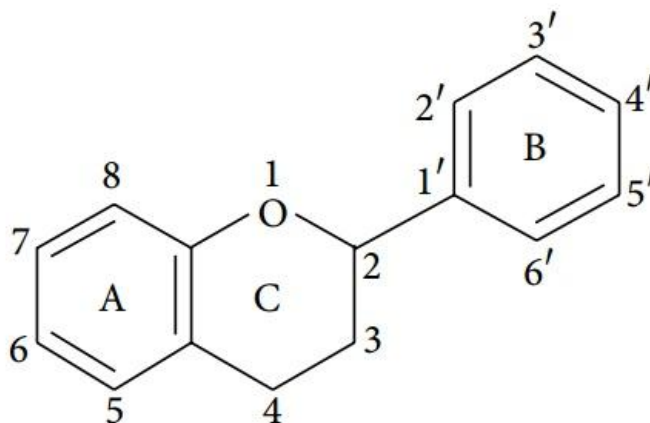


**Slika 3.** Struktura hidroksibenzojevih kiselina (Manach i sur., 2004)

### 2.2.2. FLAVONOIDI

Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida. Nalaze se u mnogim biljkama, u najvećoj koncentraciji u sjemenkama, koži i kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću (Rice-Evans i sur., 1996). Svi flavonoidi dijele isti C6-C3-C6 strukturni kostur koji se sastoji od dva aromatska C6 prstena (A i B) povezana centralnim piranskim prstenom (C) (Slika 4). Mogu se podijeliti u 6 podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavan-3-oli, izoflavoni i antocijanidini (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011). U tršlji, flavonoidi su najzastupljeniji u listovima, posebice glikozidi D-galokatehina, miricetina, kvercetina, luteolin i glikozidni izomeri kamferola (Bampouli i sur., 2014). Bobice tršlje bogate su antocijaninima, koji povećavaju antioksidativni kapacitet i induciraju autofagiju, mehanizam za poboljšanje kemoprevencije (Rodríguez-Perez i sur., 2013).

Flavonoidi su najraširenije fitokemikalije, pomažu biljkama u zaštiti od UV-svjetlosti, gljivičnih parazita, biljoždera i patogena. Redovita konzumacija namirnica bogatih flavonoidima povezana je sa smanjenom incidencijom srčanih bolesti i raka. Vrlo je teško odrediti prosječan unos flavonoida kod ljudi, obzirom na različite prehrambene navike i sklonosti prema hrani. Unatoč tome, smatra se da se dnevni unos zadovoljava, upravo zbog velike prisutnosti flavonoida u hrani (Aherne i O'Brien, 2002).



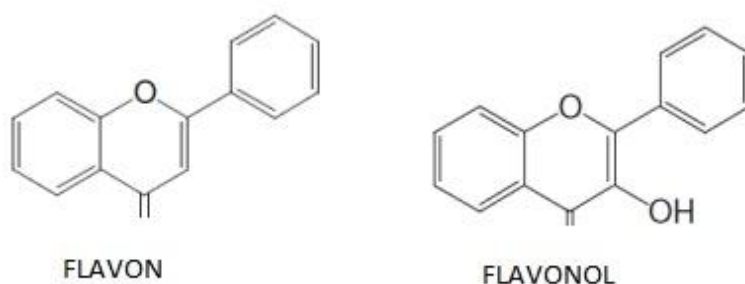
**Slika 4.** Osnovna struktura flavonoida (*Anonymous 1*)

### 2.2.2.1. FLAVONOLI

Flavonoli su najrasprostranjenija grupa flavonoida, od kojih su najpoznatiji kvercetin, kamferol i miricetin (Tsao, 2010). Najčešće se nalaze u glikozidnoj formi, a šećeri s kojima se najčešće vežu su glukoza i ramnoza, iako to mogu biti i galaktoza, ksiloza, arabinoza ili glukuronska kiselina. Nakupljaju se u vanjskom, nadzemnom dijelu biljke (lišće) zbog njihove biosinteze, koja se potiče svjetlom. Postoje razlike u koncentraciji flavonola između voća na istom stablu, pa čak i između 2 strane jedne voćke, upravo zbog različite izloženosti sunčevom svjetlu (Manach i sur., 2004). Od hrane i pića koju čovjek konzumira, flavonoli se u najvećim koncentracijama nalaze u voću, povrću, čajevima i crnom vinu (Aherne i O'Brien, 2002). Od svih flavonola, u listovima tršlje se u najvećoj koncentraciji nalazi miricetin u glikozidnoj vezi kao miricetin-3-O-rutinozid, miricetin-3-O-ramnozid i miricetin glukuronid (Dahmoune i sur., 2014).

### 2.2.2.2. FLAVONI

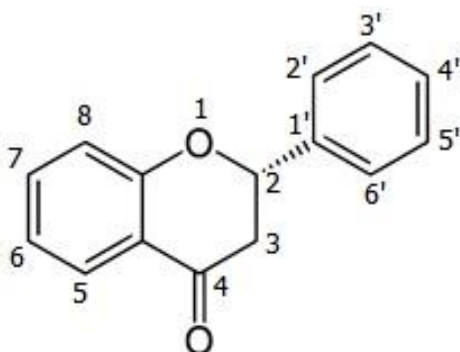
Struktura flavona vrlo je slična strukturi flavonola. Razlikuje se u nepostojanju hidroksilne skupine na položaju 3 u centralnom piranskom prstenu, koja je prisutna kod flavonola (Slika 5) (Karakaya, 2004). Glikozidi luteolina i apigenina su najčešće pronađeni flavoni u voću i povrću, posebno u peršinu i celeru. Žitarice poput prosa i pšenice sadrže C-glikozide flavona, dok su u koži nekih citrusnih voća pronađene velike količine polimetoksiliranih flavona tangeritina, nobiletina i sinensetina. Navedeni polimetoksilirani flavoni su ujedno i najhidrofobniji flavonoidi (Manach i sur., 2004). Od spomenutih flavona, u lišću tršlje pronađen je luteolin u koncentraciji 100.95 mg/kg tršlje (Rodríguez-Perez i sur., 2013).



**Slika 5.** Razlika u kemijskoj strukturi flavona i flavonola (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011)

### 2.2.2.3. FLAVANONI

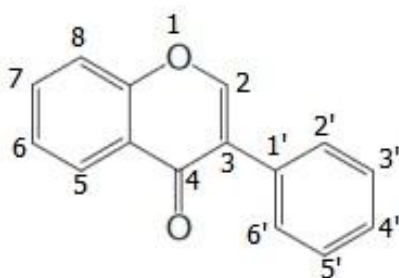
U usporedbi sa osnovnom strukturom flavonoida, flavanone karakterizira prisutnost kiralnog centra na položaju 2, i odsutstvo dvostruke veze između položaja 2 i 3 (Slika 6). U najvećoj se koncentraciji nalaze u citrusima, glikozidno vezani na disaharide poput rutinoze i neohesperidoze, koja daje gorak okus. Glavni aglikoni su naringenin u grejpu, hesperetin u naranči i eriodiktol u limunu. U manjoj mjeri, flavanoni se mogu naći u rajčici ili aromatskom bilju poput mente (Manach i sur., 2004). Iako nisu prisutni u velikim koncentracijama, mogu biti korisni zbog svog antioksidativnog djelovanja (Corradini i sur., 2011).



**Slika 6.** Osnovna struktura flavanona (*Anonymous 2*)

### 2.2.2.4. IZOFLAVONI

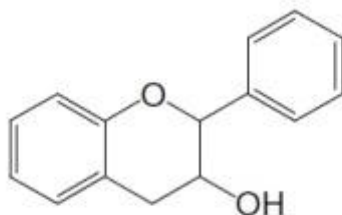
Kod izoflavona, aromatski C6 prsten (B) vezan je za centralni piranski prsten (C) na položaju 3, umjesto na položaju 2 kao kod ostalih flavonoida (Slika 7). Ovakva struktura izoflavona slična je strukturi estrogena, zbog čega imaju pseudohormonalna svojstva, uključujući i sposobnost vezanja na receptore estrogena, te su iz tog razloga klasificirani kao fitoestrogeni. U najvećoj koncentraciji nalaze se u soji, u obliku genisteina, daidzeina i gliciteina (Corradini i sur., 2011). Genistein je pronađen i u listovima tršlje, međutim, ostali oblici izoflavona nisu identificirani (Vaya i Mahmood, 2006).



**Slika 7.** Osnovna struktura izoflavona (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011)

#### 2.2.2.5. FLAVAN-3-OLI

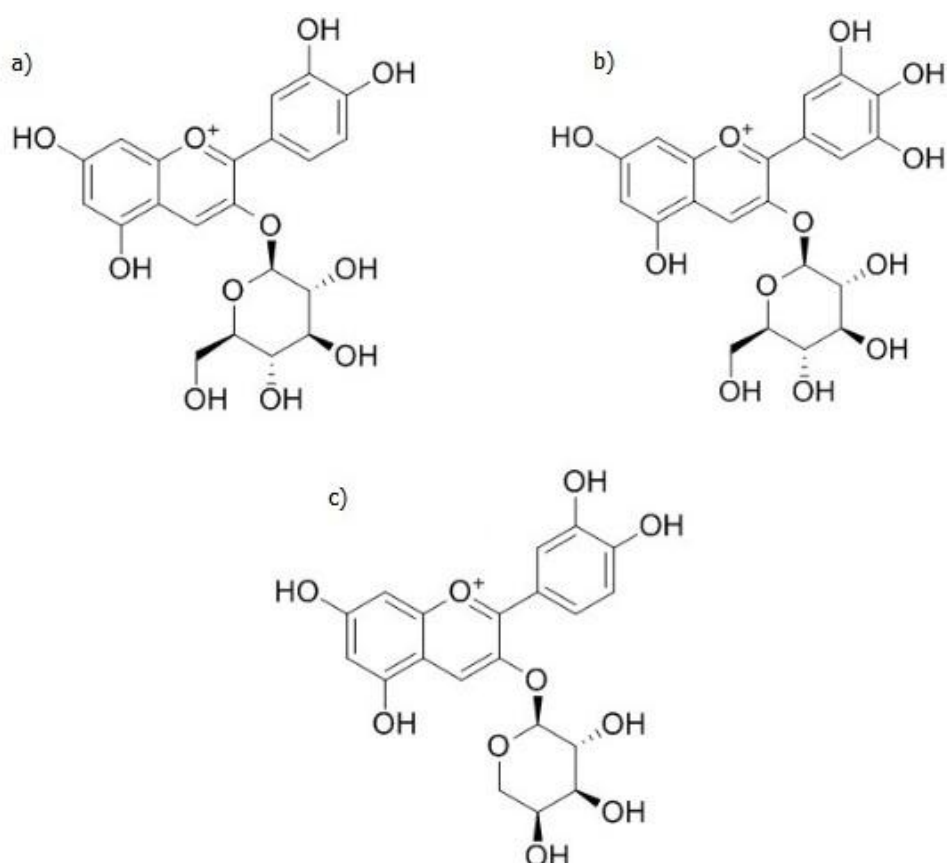
Flavan-3-oli (Slika 8), koje još nazivamo i flavanoli, pojavljuju se kao monomeri (katehini) i polimeri (proantocijanidini). Katehini se nalaze u mnogim vrstama voća i crnom vinu, međutim najbogatiji izvori su zeleni čaj i čokolada. Osim katehina, u voću je prisutan i epikatehin, dok se galokatehin i epigalokatehin nalaze u određenim sjemenkama leguminoza (Manach i sur., 2004). U listovima tršlje, pronađeni su katehin i D-galokatehin (Rodríguez-Perez i sur., 2013).



**Slika 8.** Osnovna struktura flavan-3-ola (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011)

#### 2.2.2.6. ANTOCIJANIDINI

Antocijanidini su glavne komponente crvenog, plavog i ljubičastog pigmenta u većini cvijeća, voća i povrća. U slobodnom obliku su vrlo nestabilni, stoga se najčešće pojavljuju u glikozidnom obliku, poznatiji pod nazivom antocijanini. Cijanidin, delfinidin i pelargonidin su najpoznatiji antocijanidini, a skupa sa svojim metiliranim derivatima čine 90 % svih antocijanina. Boja antocijanina najviše ovisi o pH, te stupnju hidroksilacije ili metilacije aromatskih prstenova (Tsao, 2010). Crvena boja bobica tršlje, posljedica je prisutnosti antocijanina cijanidin-3-*O*-glukozida, delfinidin-3-*O*-glukozida i cijanidin-3-*O*-arabinozida (Slika 9) (Longo i sur., 2007).



**Slika 9.** Kemijske strukture antocijanina zastupljenih u bobicama tršlje: a) cijanidin-3-O-glukozid (*Anonymous 3*), b) delfinidin-3-O-glukozid (*Anonymous 4*) i c) cijanidin-3-O-arabinozid (*Anonymous 5*)

### 2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je ključni korak u izolaciji biološki aktivnih tvari biljnih materijala (Dragović-Uzelac i sur., 2012). Ekstrakcija otapalima i ekstrakcija superkritičnim fluidima dvije su najčešće korištene tehnike za izolaciju fenolnih spojeva (Ignat i sur., 2011). Topljivost fenolnih spojeva regulirana je njihovim kemijskim sastavom u biljci, koji se može sastojati od jednostavnih do visokopolimeriziranih tvari. Postoji mogućnost interakcije fenola s drugim biljnim komponentama kao što su ugljikohidrati i proteini, što može dovesti do stvaranja kompleksa koji mogu biti prilično netopljivi (Naczki i Shahidi, 2006). Konvencionalne ili klasične metode ekstrakcije temelje se na odabiru odgovarajućeg otapala i korištenja topline kako bi se povećala topljivost i poboljšala izolacija ciljanih spojeva. Polarnost otapala je bitan čimbenik u odabiru otapala, upravo zbog razlike u polarnosti između različitih vrsta fenolnih spojeva

(Dragović-Uzelac i sur., 2012). U tu svrhu, koriste se otapala poput metanola, etanola, propanola i etil acetata u kombinaciji s vodom (Naczki i Shahidi, 2006). Konvencionalne metode poput Soxhlet ekstrakcije su dugotrajne i zahtijevaju velike količine otapala (Wang i Weller, 2006). Osim toga, tijekom ovakvih ekstrakcija može doći do gubitka biološki aktivnih tvari uslijed povišene temperature. Upravo zbog spomenutih nedostataka, klasične metode ekstrakcije zamjenjuju se suvremenim metodama poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ekstrakcije superkričnim CO<sub>2</sub> (Dragović-Uzelac i sur., 2012).

Upotreba ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji bila je široko istraživano područje početkom 21.st.. Prilikom ultrazvučne ekstrakcije, zvučni valovi putuju kroz sustav i izazivaju ekspanziju i kompresiju uslijed čega dolazi do boljeg kontakta molekula. Uslijed ekspanzije dolazi kavitacije, fenomena koji označava stvaranje mjehurića plina u tekućem stanju te nastanka negativnog tlaka (Pingret i sur., 2013). Mjehurići nastaju, rastu i na kraju pucaju uslijed pojave kavitacije kada dolazi do bržeg prijenosa na krutu fazu unutar tekućeg medija. Osim što je brža, metoda ultrazvučne ekstrakcije je jeftina, jednostavna, zahtjeva manju količinu otapala i manju temperaturu rada, čime se omogućuje i ekstrakcija termolabilnih spojeva (Wang i Weller, 2006).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima našla je svoju primjenu zbog značajne redukcije vremena ekstrakcije čime je postala ekološki prihvatljiva (Dragović-Uzelac i sur., 2012). Tretiranjem biljnog materijala zračenjem mikrovalova tijekom ekstrakcije uglavnom se postiže povećanje ekstrakcije sekundarnih biljnih metabolita i tvari arome. Zagrijavanjem vode u matriksu uzorka dolazi do oslobađanja vodene pare u stanicama što rezultira puknućem staničnih membrana. Na taj način se pospješuje difuzija sekundarnih metabolita u otapalo (Starmans i Nijhuis, 1996).

Ekstrakcija superkričnim fluidima ima brojne prednosti pred konvencionalnim metodama. Superkrično stanje se postiže kada se temperatura i tlak fluida podignu iznad njegove kritične točke. Superkrični fluidi imaju svojstva tekućine i plina. Moć otapanja ovisi o njihovoj gustoći, koja se može jednostavno prilagoditi mijenjanjem tlaka i/ili temperature. Nadalje, imaju veći difuzni koeficijent, nižu viskoznost i manju površinsku napetost od klasičnih otapala što osigurava brži prijenos mase. Upravo zbog navedenih svojstava, odabirom ove metode skraćuje se vrijeme ekstrakcije (Wang i Weller, 2006). Uobičajeni fluidi koji se koriste za ovaj tip ekstrakcije su CO<sub>2</sub>, etilen, etan, etanol, propan, benzen, toulén i voda (Mendes i sur., 2003).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Listovi i bobice tršlje brani su na 4 različite lokacije u razdoblju 4.-7.10.2017.. Točne lokacije s koordinatama navedene su u Tablici 2. Uzorci su prenošeni u vinskim vrećama i isti dan kada su se brali su stavljeni u prostoriju sobne temperature, te ostavljeni 5 dana da se posuše. Ostali uzorci za analize su nakon 5 dana samljeveni i skladišteni na +4 °C do provođenja analize.

**Tablica 2.** Podaci o lokacijama i berbi listova i bobica

LOKACIJA	KOORDINATE	DATUM BERBE
LUN	44°40'59.3"N 14°45'15.2"E	7.10.2017.
VELA LUKA	42°57'40.3"N 16°43'17.7"E	4.10.2017.
BARBARIGA	44°59'27.6"N 13°44'12.0"E	7.10.2017.
HVAR	43°07'51.5"N 16°56'34.6"E	7.10.2017.

#### 3.1.1. POSTUPAK EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA LISTOVA I BOBICA TRŠLJE

Smrznuti uzorci se stave na sobnu temperaturu i usitne kako bi se aktivni sastojci što bolje ekstrahirali. Za provođenje ekstrakcije odvagano je 1g svakog uzorka ( $\pm 0,0001$ ) u Erlenmayerovu tikvicu. Uzorcima se doda 40mL otapala za ekstrakciju (70 %-tni etanol), te se stavi na ekstrakciju u ultrazvučnu kupelj na temperaturi 50°C kroz 20 minuta. Nakon ekstrakcije, ekstrakt se filtrira u odmjernu tikvicu od 50mL i nadopuni do oznake otapalom za ekstrakciju. Ekstrakti se prenesu u plastične falkonice i skladište na +4 °C do provođenja analize.

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA**

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

#### *Aparatura i pribor:*

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Staklene kivete
- Tehnička vaga Mettler (točnosti  $\pm 0,01\text{g}$ )
- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete od 100 i 1000  $\mu\text{L}$
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje

#### *Reagensi:*

- Etanol, 96 %-tni
- Metanol, 100 %-tni
- Aluminijev klorid, 10 %-tni

Priprema: 1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid-heksahidrat) otopi se u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat, 1 M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetina (100 mg/L)

Priprema: Odvaži se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi

u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg/L.

#### *Razrijeđenja:*

Ekstrakti listova i bobica razrijeđeni su prije analize na sljedeći način:

Ekstrakti listova tršlje sa Hvara i Korčule razrijeđeni su 10x.

Ekstrakti listova tršlje iz Luna i Barbarige razrijeđeni su 5x.

Ekstrakti bobica tršlje sa Hvara razrijeđeni su 2x.

Ekstrakti bobica tršlje sa Korčule, Luna i Barbarige nisu razrijeđeni prije analize.

#### *Postupak određivanja*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

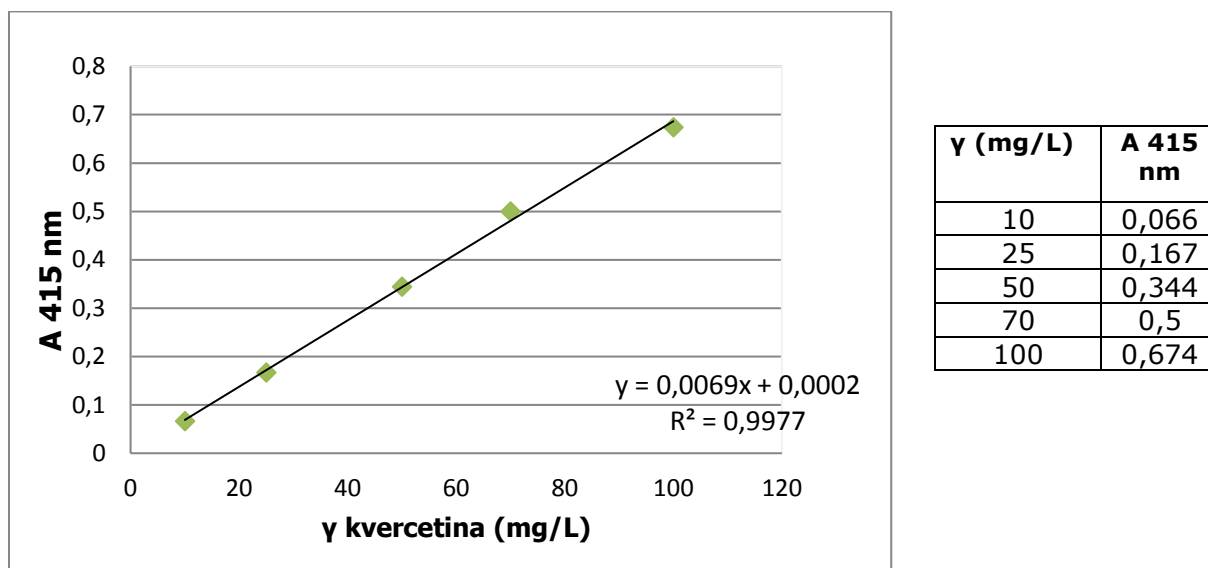
#### *Izrada baždarnog pravca*

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2.5, 5 i 7.5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake 100 %-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L.

Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 %-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL).

Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračunava se prema dobivenoj jednadžbi pravca i rezultat se izrazi kao mg QE (ekvivalenta kvercetina) /g.



**Slika 10.** Ovisnost apsorbancije o koncentraciji kvercetina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0069X + 0,0002$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

### **3.2.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJA UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I FLAVONOLA**

Određivanje se provodi u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

#### *Aparatura i pribor:*

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje

#### *Reagensi:*

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %
- Etanol, 96 %-tni
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1g/L HCl (u 96 %-tnom etanolu)

Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake.

- Klorovodična otopina masene koncentracije 2g/L HCl

Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard kafeinske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaži se 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 80 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80 %-tnim metanolom.

- Standard kvercetina (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Razrijeđenja:

Ekstrakti listova i bobica su razrijeđeni prije analize na sljedeći način:

Ekstrakti listova tršlje sa Hvara razrijeđeni su 5x.

Ekstrakti listova tršlje iz Luna, Barbarige i Korčule razrijeđeni su 2x.

Ekstrakti bobica tršlje sa Hvara razrijeđeni su 2x.

Ekstrakti bobica tršlje sa Korčule, Luna i Barbarige nisu razrijeđeni prije analize.

#### *Postupak određivanja*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250  $\mu$ L ekstrakta, 250  $\mu$ L 1g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

#### *Izrada baždarnog pravca*

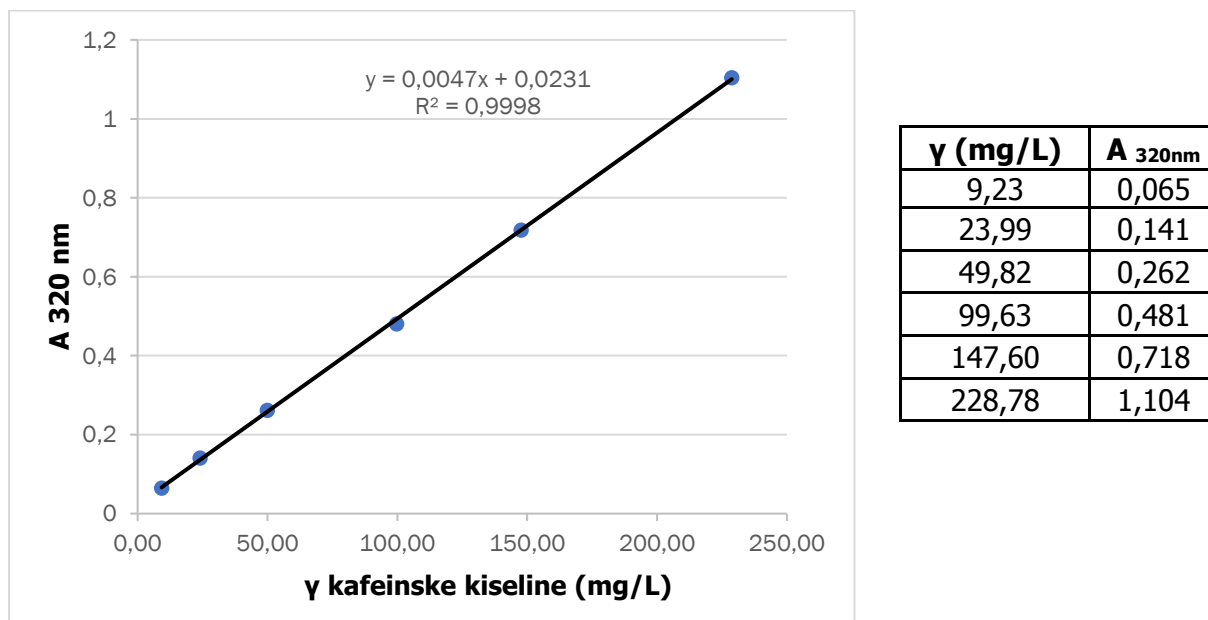
Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe pravca za kvercetin.

##### a)Kafeinska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 500 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 9,23, 23,99, 49,82, 99,63, 147,60, 228,78 mg/L.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto

ekstrakta uzima 80 %-tni metanol. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.



**Slika 11.** Ovisnost apsorbancije o koncentraciji kafeinske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0047X + 0,0231$$

gdje je:

$Y$  – apsorbancija pri 320 nm,

$X$  – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L).

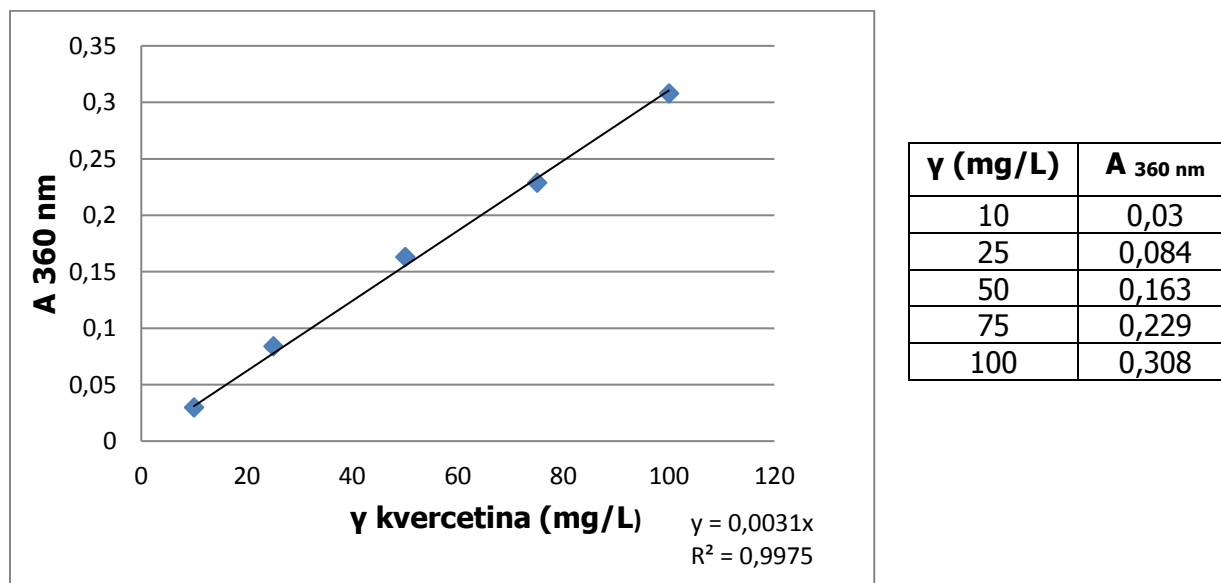
Koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračunate se pomoću jednadžbe pravca i izražene kao mg CAE (ekvivalenta kafeinske kiseline) /g.

#### b) Kvercetin

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 2,5, 5, 10, 25, i 50 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0.25, 0.5, 1, 2.5 i 5 mL i nadopuni

100 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm.



**Slika 12.** Ovisnost apsorbancije o koncentraciji kvercetina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0031 X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L)

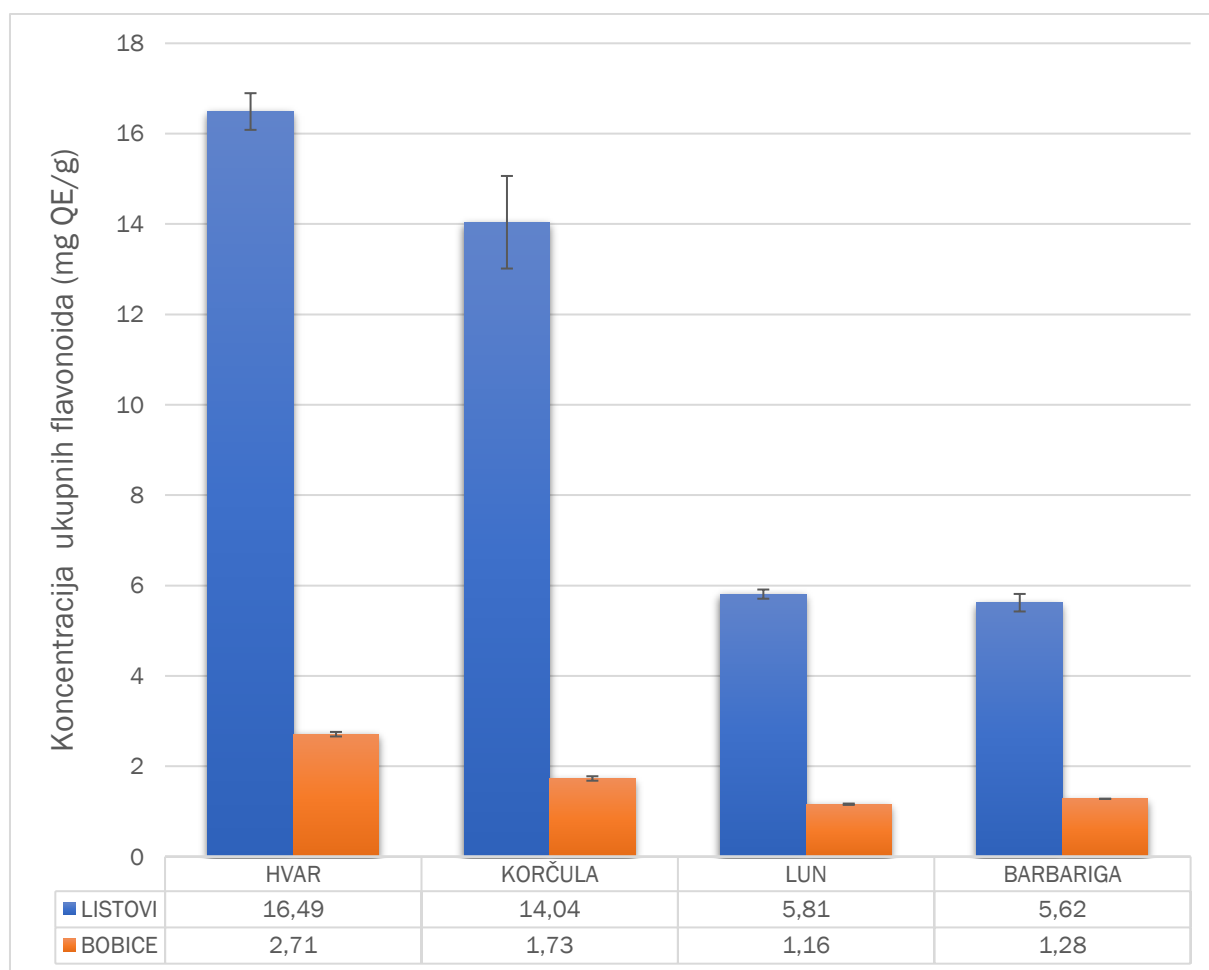
Koncentracije ukupnih flavonola izračunate su prema jednadžbi pravca i izražene kao mg QE (ekvivalenta kvercetina) /g.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u ekstraktima listova i bobica tršlje. Cilj ovog rada bio je prikazati utjecaj lokacije (rasta/uzgoja) na fenolni sastav lista i bobica tršlje.

### 4.1. UKUPNI FLAVONOIDI

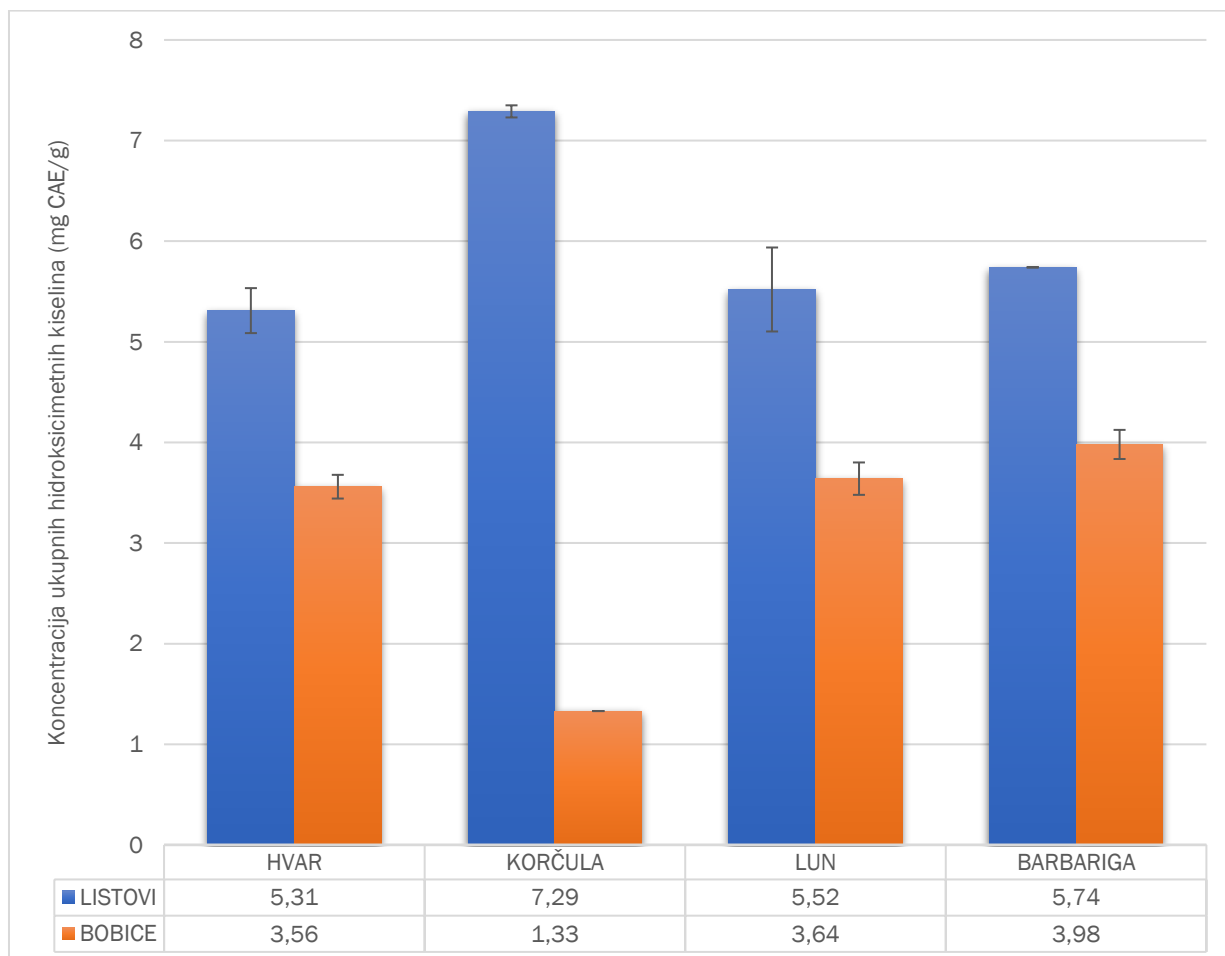


**Slika 13.** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja masene koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima listova i bobica tršlje ubranim na 4 različite lokacije

Na slici 13 su prikazane srednje vrijednosti masenih koncentracija ukupnih flavonoida dvaju paralelnih mjerenja za uzorke listova i bobica tršlje. U najvećoj koncentraciji flavonoidi su prisutni kod tršlje sa Hvara, u koncentraciji 16,49 mg QE/g kod listova i 2,71 mg QE/g kod bobica. Nešto manja koncentracija zabilježena je kod uzoraka sa Korčule, u iznosu od 14,04

mg QE/g za listove i 1,73 mg QE/g za bobice, a nakon njih slijede listovi iz Luna te bobice iz Barbarige. Najmanja koncentracija flavonoida zabilježena je kod listova iz Barbarige i bobica iz Luna. Gledajući odnos listova i bobica, na svim lokacijama je koncentracija flavonoida veća u lišću. Remila i suradnici (2015) došli su do istog zaključka uspoređujući koncentracije ukupnih flavonoida u listovima i bobicama iz Alžira. Koncentracija ukupnih flavonoida bila je puno veća u listovima, u vrijednosti od 139,38 mg RE/g, dok je u bobicama koncentracija iznosila 6,28 mg RE/g. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na puno veće koncentracije ukupnih flavonoida u tršlji iz Alžira od vrijednosti dobivenih u ovom radu. Ovakve razlike u koncentracijama komentirali su Belhachat i suradnici (2017), čija je vrijednost ukupnih flavonoida u bobicama iz Alžira iznosila 13,4 mg QE/g. Kao moguće razloge dobivanja različitih rezultata naveli su korištenje različitih metoda i uvjeta ekstrakcije, te geografsko podrijetlo, klimatske uvjete i stupanj zrelosti biljke. Slične rezultate dobili su i Bouyahya i suradnici (2018) u svom istraživanju na bobicama tršlje iz Maroka. Koncentracija ukupnih flavonoida iznosila je 13,76 mg QE/g. Koncentracija ukupnih flavonoida u bobicama zabilježena u njihovim istraživanjima je otprilike 5 puta veća od najveće zabilježene koncentracije u bobicama iz ovog rada.

## 4.2. UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE

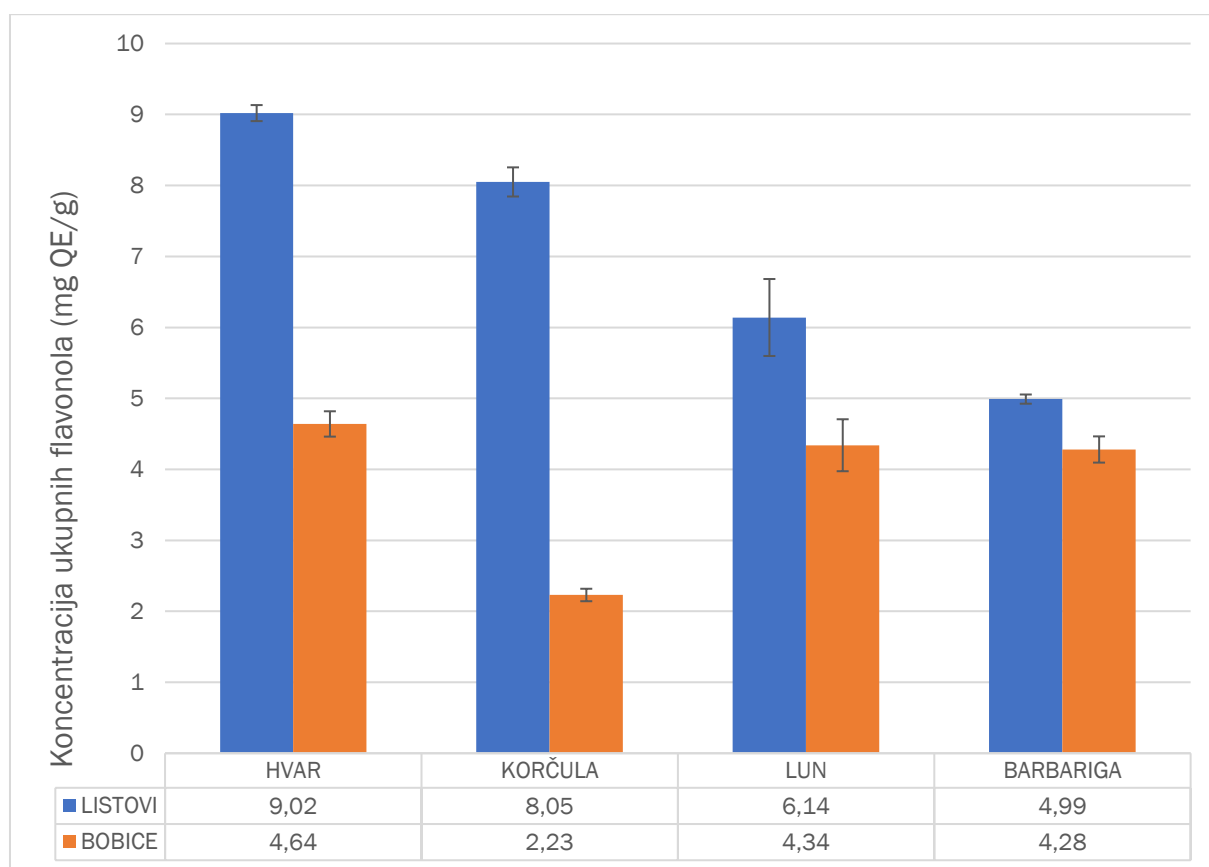


**Slika 14.** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja masene koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima listova i bobica tršlje ubranim na 4 različite lokacije

Na slici 14 su prikazane masene koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima listova i bobica tršlje ubranim na 4 različite lokacije. Najveća koncentracija iznosila je 7,29 mg CAE/g i određena je u listovima tršlje sa Korčule, dok su kod bobica sa iste lokacije hidroksicimetne kiseline zabilježene u najmanjoj količini, u iznosu od 1,33 mg CAE/g. Uspoređujući bobice svih uzoraka, najveća koncentracija određena je u uzorcima iz Barbarige. Među uzorcima listova, najmanja koncentracija iznosila je 5,31 mg CAE/g, određena u listovima sa Hvara. Kao i kod flavonoida, koncentracije hidroksicimetnih kiselina u svim uzorcima su veće u lišću u odnosu na bobice. Rezultati istraživanja koje su proveli Botsaris i suradnici (2015), pokazuju veće koncentracije hidroksicimetnih kiselina u listovima i bobicama tršlje iz Cipra. Međutim, u ovom radu su istraživali i utjecaj korištenja različitih otapala, tijekom ekstrakcije

potpomognute ultrazvukom, na koncentracije fenolnih spojeva. Korišteni su metanol, butanol, aceton i voda. Kao najbolje otapalo pokazao se metanol, u čijim ekstraktima je koncentracija hidroksicimetnih kiselina iznosila 15,5 mg CAE/g u listovima i 22,2 mg CAE/g u bobicama. Također, rezultati dobiveni korištenjem svih drugih otapala pokazuju veće koncentracije hidroksicimetnih kiselina u odnosu na rezultate dobivene u ovom radu. Etanol nije korišten u spomenutom istraživanju, pa se rezultati ne mogu sa preciznošću uspoređivati.

#### 4.3. UKUPNI FLAVONOLI



**Slika 15.** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja masene koncentracije ukupnih flavonola u ekstraktima listova i bobica tršlje ubranim na 4 različite lokacije

Na slici 15 su prikazane masene koncentracije ukupnih flavonola u ekstraktima listova i bobica tršlje ubranim na 4 različite lokacije. Koncentracije ukupnih flavonola u listovima kreću se od 4,99 mg QE/g do 9,02 mg QE/g. U bobicama, taj raspon kreće se od 2,23 mg QE/g do 4,28 mg QE/g. Slično kao i kod ukupnih flavonoida, najveća koncentracija nalazi se u listovima i

bobicama sa Hvara, dok je najmanja koncentracija zabilježena u bobicama sa Korčule. Gledajući odnos listova i bobica, na svim lokacijama je koncentracija ukupnih flavonola veća u listovima. Utjecaj lokacije na ukupne flavonole u bobicama tršlje također su ispitali Mezni i suradnici (2018). Uzeli su uzorke sa 8 lokacija u Tunisu kod kojih su koncentracije ukupnih flavonola bile u rasponu od 24,23 mg QE/kg do 377,44 mg QE/kg. Ovakvu varijabilnost u koncentracijama objasnili su razlikama u klimatskim uvjetima i nadmorskoj visini lokacije.

U istraživanju koje su proveli Botsaris i suradnici (2015), korištenjem metanola kao otapala, dobiveni rezultati ukazuju na veću koncentraciju ukupnih flavonola u bobicama iz Cipra, u odnosu na listove što je suprotno našim rezultatima. Također, koncentracije su puno veće u spomenutom istraživanju nego u ovom radu. Kod bobica, koncentracija ukupnih flavonola iznosi 33,1 mg RE/g, a kod listova iznosi 29,9 mg RE/g.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Na sve 4 lokacije su kod listova tršlje zabilježene značajno veće koncentracije ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u odnosu na bobice.
2. Najveće koncentracije ukupnih flavonoida zabilježene su u uzorcima sa Hvara, u kategoriji listova i bobica, u iznosu od 16,49 mg QE/g kod listova i 2,71 mg QE/g kod bobica.
3. Najveće koncentracije ukupnih flavonola također su zabilježene u uzorcima sa Hvara, u kategoriji listova i bobica, u iznosu od 9,02 mg QE/g kod listova i 4,64 mg QE/g kod bobica.
4. U uzorku listova sa Korčule, zabilježena je najveća koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina, u iznosu od 7,29 mg CAE/g. Među bobicama, najveća koncentracija u iznosu od 3,98 mg CAE/g, pronađena je u uzorku iz Barbarige.

## 6. LITERATURA

- Aherne, S. A., O'Brien, N.M. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**: 75-81.
- Anonymous 1, < <https://www.freelandtime.com/micoterapia/approfondimenti/i-flavonoidi.html>>. Pristupljeno 26.lipnja 2018.
- Anonymous 2 (2017) <<https://en.wikipedia.org/wiki/Flavanone>>. Pristupljeno 26.lipnja 2018.
- Anonymous 3 (2011) < <http://www.chemfaces.com/natural/Cyanidin-3-O-glucoside-chloride-CFN99740.html>>. Pristupljeno 26.lipnja 2018.
- Anonymous 4, < <http://www.biorbyt.com/delphinidin-3-o-glucoside-chloride-orb389967>>. Pristupljeno 26.lipnja 2018.
- Anonymous 5 (2011) <<http://www.chemfaces.com/natural/Cyanidin-3-O-arabinoside-chloride-CFN92041.html>>. Pristupljeno 26.lipnja 2018.
- Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Nektarios, A., Krokida, M., Magoulas, K. (2014) Evaluation of total antioxidant potential of Pistacia lentiscus var. chia leaves extracts using UHPLC-HRMS. *Journal of Food Engineering* **167**: 25-31.
- Belhachat, D., Aid, F., Mekimene, L., Belhachat, M. (2017) Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of Pistacia lentiscus berries ethanolic extract growing in Algeria. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* **10**: 273-285.
- Benhammou, N., Bekkara, F.A., Panovska, T.K. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2(2)**: 22-28.
- Botsaris, G., Orphanides, A., Yiannakou, E., Gekas, V., Goulas, V. (2015) Antioxidant and antimicrobial effects of Pistacia lentiscus L. extracts in pork sausages. *Food Technology and Biotechnology* **53 (4)**: 472–478.
- Bouyahya, A., Dakka, N., Talbaoui, A., El Massaoui, N., Abrini, J., Bakri, Y. (2018) Phenolic contents and antiradical capacity of vegetable oil from Pistacia lentiscus. *Journal of Materials and Environmental Science* **9(5)**: 1518-1524.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M. H. S., Shams-Ardekani, M. R., Rahimi, R. (2013) Five Pistacia species (P. vera, P. atlantica, P. terebinthus, P. khinjuk, and P. lentiscus): A review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal* **15**, <<https://doi.org/10.1155/2013/219815>>. Pristupljeno 2.lipnja 2018.

- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **10(3)**: 178-182.
- Chen, J.H., Ho, C.T. (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 2374-2378.
- Cherbal, A., Kebieche, M., Madani, K., El-Adawi, H. (2012) Extraction and valorization of phenolic compounds of leaves Algerian Pistacia lentiscus. *Asian Journal of Plant Sciences* **11 (3)**: 131-136.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, Laganà, A. (2011) Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research* **25(5)**: 469-495.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K. (2014) Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products* **61**: 31–40.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**: 7313-7352.
- Dragović-Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Jukić, M., Penić, M., Dent, M. (2012) The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technology and Biotechnology* **50 (3)**: 377–383.
- Gardeli, C., Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Theodosios, K., Komaitis, M. (2008) Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* **107**: 1120-1130.
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. (2011) Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* **5(31)**: 6697-6703.
- Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83(12)**: 1238-1247.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126(4)**: 1821-1835.
- Kaliora, A.C., Mylona, A., Chiou, A., Petsios, D.G., Andrikopoulos, N.K. (2005) Detection and identification of simple phenolics in Pistacia lentiscus resin. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **27(2)**: 289-300.



- Naczek, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41(5)**: 1523-1542.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vourela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 3954-3962.
- Karakaya, S. (2004) Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44(6)**: 453-464.
- Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rogder, A. (2005) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of Pistacia lentiscus var. chia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 7681-7685.
- Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G. (2007) Identification and quantification of anthocyanins in the berries of Pistacia lentiscus L., Phillyrea latifolia L. and Rubia peregrina L.. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **8**: 360–364.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**: 727–747.
- Mehenni, C., Atman-Kilani, D., Dumarcay, S., Perrin, D., Gérardin, P., Atmani, D. (2016) Hepatoprotective and antidiabetic effects of Pistacia lentiscus leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis* **24**: 653-669.
- Mendes, R., Nobre, B., Cardoso, M., Pereira, A., Palavra, A. (2003) Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta* **356**: 328-334.
- Mezni, F., Slama, A., Ksouri, R., Hamdaoui, G., Khouja, M., Khaldi, A. (2018) Phenolic profile and effect of growing area on Pistacia lentiscus seed oil. *Food Chemistry* **257**: 206-210.
- Nikolić, T., Kovačić, S., Ruščić, M., Milović, M., Stamenković, V., Jasprica, N., Bogdanović, S., Topić, J. (2008) Flora jadranske obale i otoka – 250 najčešćih vrsta, Školska knjiga d.d. str. 119
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2013) Ultrasound- assisted extraction. U: Natural product extraction: Principles and applications, Rostagno M.A. i Prado J.M., ur., The Royal Society of Chemistry, RSC Publishing, str. 89-112.
- Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J.L., Azib, L., Richard, T., Atmani, D. (2015) Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of Pistacia lentiscus (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine* **7(3)**: 274-286.

- Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20** (7): 933-956.
- Rodríguez-Perez, C., Quirantes-Piñe, R., Amessis-Ouchemoukh, N., Khodir, M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2013) A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from Pistacia lentiscus leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **77**: 167-174.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002) Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of Pistacia lentiscus L.. *Phytochemical Analysis* **13**: 79–86.
- Starmans, D., Nijhuis, H.H. (1996) Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends in Food Science & Technology* **7**(6): 191-197.
- Trabelsi, H., Cherif, O.A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., Boukhchina, S., Mayer, P. (2012) Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of Pistacia lentiscus L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry* **131**: 434-440.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231-1346.
- Vaya, J., Mahmood, S. (2006) Flavonoid content in leaf extracts of the fig (Ficus carica L.), carob (Ceratonia siliqua L.) and pistachio (Pistacia lentiscus L.). *BioFactors* **28**(3-4): 169-175.
- Wang, L., Weller, C. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* **17**(6): 300-312.

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Valerija Fabijanić  
ime i prezime studenta